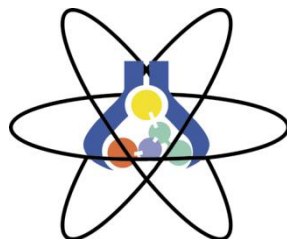


**УНИВЕРЗИТЕТ “Св. КИРИЛ И МЕТОДИЈ” – СКОПЈЕ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ХЕМИЈА**



Павлинка Кокошкарлова

**ДИЗАЈНИРАЊЕ НА АМПЕРОМЕТРИСКИ
СЕНЗОР ЗА ДИРЕКТНО СИМУЛТАНО
ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БИЛИРУБИН, МОЧНА
КИСЕЛИНА И АЛБУМИНИ ВО ХУМАН СЕРУМ
СО КВАДРАТНО БРАНОВА ВОЛТАММЕТРИЈА**

*семинарска работа по предметот
Методологија на научноистражувачката работа*

Скопје, 2021

СОДРЖИНА

ABSTRACT	3
<i>Keywords</i>	<i>3</i>
АПСТРАКТ	4
<i>Клучни зборови</i>	<i>4</i>
ВОВЕД	5
ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....	7
ТЕОРЕТСКИ ОСНОВИ.....	14
ЗАКЛУЧОК	17
ЛИТЕРАТУРА	17

DESIGNING OF AN AMPEROMETRIC SENSOR FOR DIRECT SIMULTANEOUS DETERMINATION OF BILIRUBIN, URIC ACID AND ALBUMIN WITH SQUARE WAVE VOLTAMMETRY

ABSTRACT

Voltammetric sensors that are designed for the direct determination of physiological compounds in different systems attract significant interest in last 20 years. The cheap experimental set up, quick time for obtaining instrumental response, and the ability to determine multiple compounds present in complex matrix make the voltammetric techniques suitable tools for designing simple biosensors. When it is about voltammetric determination of physiological compounds in human serum, major troubles come from the complex matrix and the pollution of the working electrode that occurs commonly via adsorption of some lipophilic systems. In this work we give a short overview of the voltammetric techniques used for construction of amperometric sensors for direct determination of physiological compounds in human serum. We also give a brief overview of some voltammetric sensors, which are reported to be relevant tools for direct detection of uric acid, bilirubin, albumines and some other important physiological systems in human serum. Construction of a reliable voltammetric sensor for simultaneous detection of uric acid, bilirubin and albumines will be a major task I will work on in the course of my PhD studies.

Keywords

Voltammetric sensors, square-wave voltammetry, human serum, uric acid., bilirubin

АПСТРАКТ

Волтаметриските сензори дизајнирани за директно определување на физиолошките соединенија во различни системи привлекуваат значителен интерес во последниве 20 години. Ниската цена, брзото време за добивање на соодветен одговор како и можноста за определување на повеќе соединенија присутни во комплексниот матрикс, ги прават волтаметриските техники соодветни алатки за дизајнирање на едноставни биосензори.

Кога станува збор за волтаметриско определување на физиолошките соединенија во хуман серум, главните проблеми доаѓаат од сложениот матрикс и загадувањето на работната електрода кое се јавува најчесто преку адсорпција на некои липофилни системи.

Во ова дело даваме краток преглед на волтаметриските техники кои се користат за конструкција на амперометриски сензори за директно определување на физиолошките соединенија во хуман серум. Исто така даваме краток преглед на некои волтаметриски сензори, за кои се вели дека се релевантни алатки за директно определување на мочна киселина, билирубин, албумини и некои други важни соединенија во хуманиот серум.

Изградбата на сигурен волтаметриски сензор за истовремено откривање на мочна киселина, билирубин и албумини ќе биде главна задача на која ќе работам во текот на докторските студии.

Клучни зборови

Волтаметриски сензори, квадратно бранова волтаметрија, хуман серум, мочна киселина, билирубин

ВОВЕД

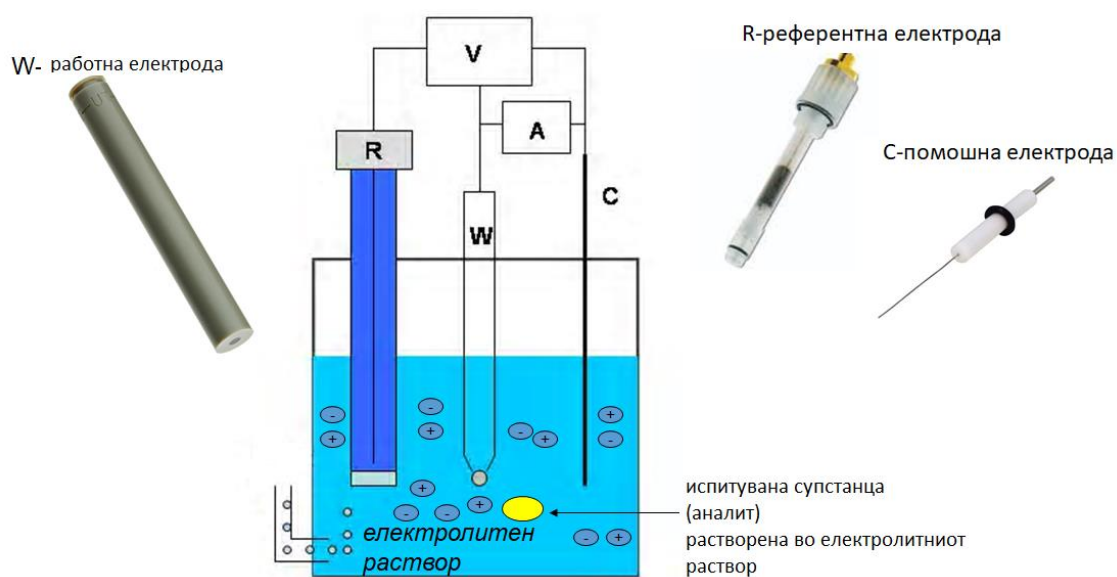
Електрохемијата е дел од физичката хемија чија примарна задача е да ги проучува хемиските процеси при кои доаѓа до размена на полнеж (електрони или јони) помеѓу два системи, што се случуваат на границата помеѓу нив. Електрохемијата во најголем дел е фокусирана да ги проучува системите во кои доаѓа до размена на електрони помеѓу даден електричен спроводник (електрода) и аналит (супстанца што се испитува). Електрохемиските техники се неизоставен дел од инструментацијата на голем број научноистражувачки лаборатории од областа на хемијата, физиката, биохемијата, фармацијата и заштитата на животната околина. Тоа е поради ниската цена на овие техники, како и поради нивната брзина за изведување на експерименти. Испитувањата на механизмите на електрохемиска трансформација на границата електрода/електролит кај голем број важни органски и неоргански супстанции, овозможуваат електрохемиските техники да се применуваат не само во аналитички, туку и во механистички студии. Во денешно време, електрохемиските техники се главна алатка што помага во студирање на редокс (редокс = редукциски-оксидациски) трансформациите на голем број важни системи, во разбирањето на кинетичките и термодинамичките процеси што влијаат врз процесите на трансфер на полнеж, како и за проучување на голем број физички феномени што се случуваат на површината од т.н. работна електрода (атсорпција, кристализација и сл). Брзината, осетливоста и можноста да се проучуваат органски и неоргански аналити, се едни од главните карактеристики што овозможуваат широка примена на електрохемиските техники за аналитички цели.

Едни од најважните електрохемиски техники се т.н. **волтаметриски техники**. Волтаметриските техники се користат за квалитативна и квантитативна анализа на хемиски системи што можат да разменуваат електрони со даден електричен спроводник (работна електрода). Зборот **волтаметрија** е кратенка од *волт-ампер-метрија*. Самиот збор волтаметрија имплицира дека движечка сила во овие техники е електричниот потенцијал (или поточно електрична потенцијална разлика), додека интензивната величина што се детектира во системот е јачината на електричната струја. Поради едноставноста на волтаметриските системи за изведување на експерименти, како и поради ниската цена на анализите и краткото време на изведување на експерименти, волтаметриските техники се погодни за анализа на голем број органски и неоргански аналити што се присутни во многу мали концентрации. На пример, во таканаречените “стрипинг волтаметриски

техники”, може да се анализираат аналити и во концентрации што се пониски од 10^{-9} mol/L.

Главните недостатоци на волтаметриските техники се отсликуваат во можностите за загадување (онечистување) на површината од работната електрода, кога овие техники се применуваат за анализа на комплексни примероци. Лимитираното подрачје на аплицирани потенцијали во волтаметријата е главно детерминирано од типот на електродите што се користат, како и од својствата на електролитните раствори присутни во електрохемиската ќелија. Волтаметриските експерименти се едноставни за изведба и тие најчесто се одвиваат во т.н. електрохемиски ќелии.

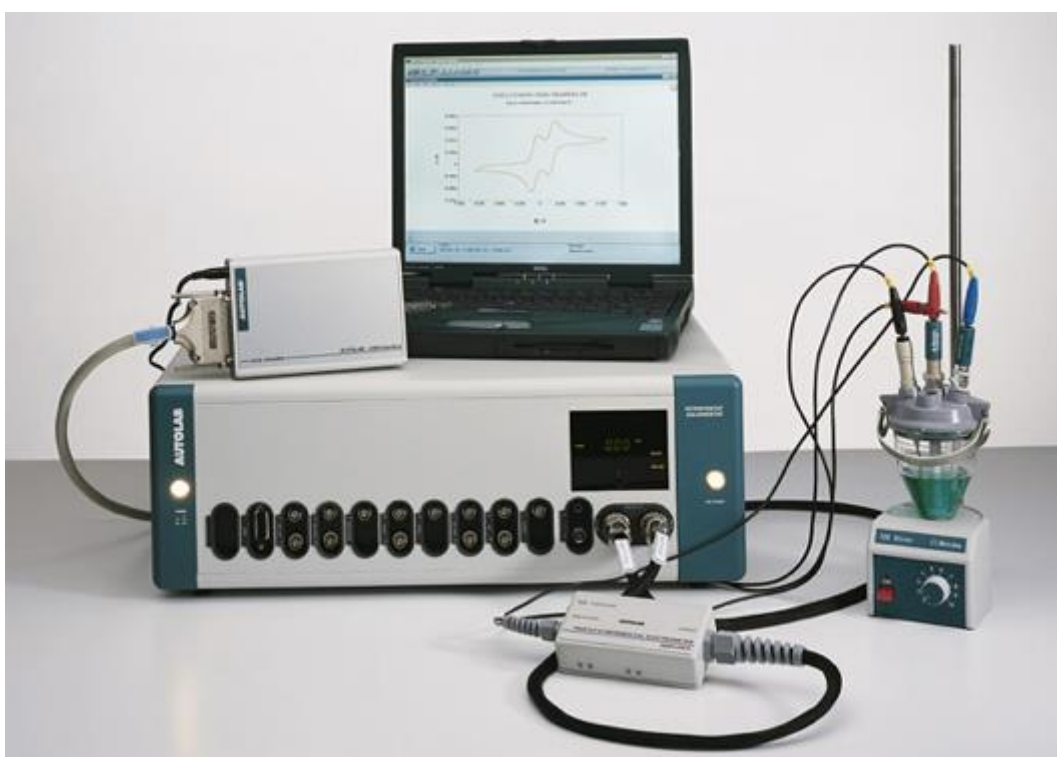
Електрохемиската ќелија е систем што се состои најчесто од три електроди и тоа: работна електрода, референтна и помошна електрода, што се потопени во раствор на електролит, во кој е растворен анализот од интерес. Шематски приказ на една електрохемиска ќелија со најважните елементи е прикажан на слика 1.



Слика 1. Шематски приказ на електрохемиска ќелија и електролит што се употребуваат во волтамметриските техники

Во волтамметриските техники, физичката величина што се детектира и мери е јачината на електричната струја што протекува како функција од нанесената потенцијалната разлика. Електричната струја е проток на полнеж (електрони и/или јони) во единица време. Струјата во волтамметријата тече во услови кога поради поларизацијата на работната (индикаторска) електрода се случува електрохемиска

трансформација (оксидација или редукција) на испитуваниот аналит на површината од работната електрода. Соодветниот аналит, што може да биде органска молекула, неоргански катјон или анјон, најчесто е растворен во даден електролит, во кој водата е растворувач во најголем дел од волтамметриските експерименти. Анализот и електролитот се сместени во стаклен сад, и во него се вронети работна електрода, референтна електрода и помошна електрода, Овие три електроди се поврзани во едно затворено електрично коло, во кое потенцијалната разлика се контролира од надворешен извор, преку т.н. потенциостат. Еден реален електрохемиски систем што се применува во волтамметриските експерименти е прикажан на слика 2.

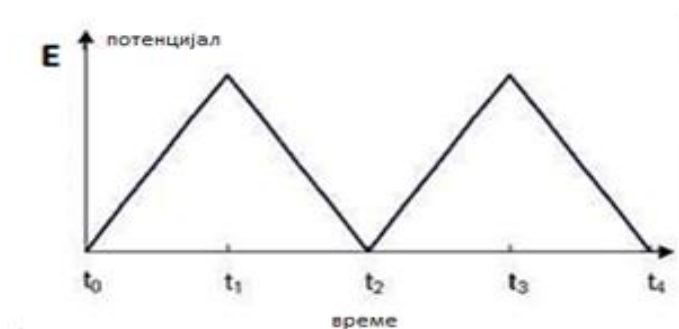


Слика 2. Електрохемиски систем што се користи во волтамметрија

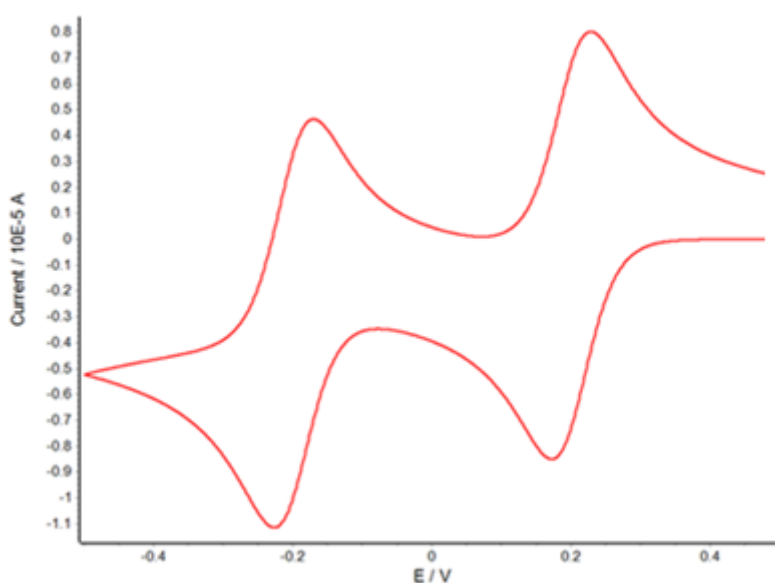
ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

Од волтамметриските методи што се применуваат како за механизнички, така и за аналитички цели, најпознати се цикличната волтамметрија и т.н. пулсни волтамметриски техники. Во цикличната волтамметрија, потенцијалот се менува во циклуси од даден почетен до дефиниран краен потенцијал и потоа во обратна насока. Доколку потенцијалот се менува од позитивни кон негативни вредности, тогаш во таа насока се следат процесите на редукција на анализот на работната

електрода. Кога потенцијалот се менува во насока од крајната кон почетната дефинирана вредност, тогаш се следат процесите на оксидација. Формата на потенцијалот и изгледот на цикличниот волтамограм се прикажани на слика 3 и 4, соодветно.



Слика 3. Форма на потенцијалот во циклична волтамметрија како функција од времето



Слика 4. Приказ на цикличен волтамограм кај комплексна електрохемиска трансформација што се случува во два последователни чекори

Главни карактеристики на секој цикличен волтамограм се интензитетот на струјата на пикот во редукциска насока при промена на потенцијалот од позитивни кон негативни вредности (катоден пик) и на пикот во оксидациона насока (аноден пик), како и односот на овие струи. Покрај тоа, потенцијалната раздвоеност на катодниот и анодниот пик, како и нивната положба на потенцијалната скала, се важни параметри за кинетички и термодинамички карактеризации кај оваа техника. Цикличната волтамметрија, иако е можно да се применува и во аналитички цели за

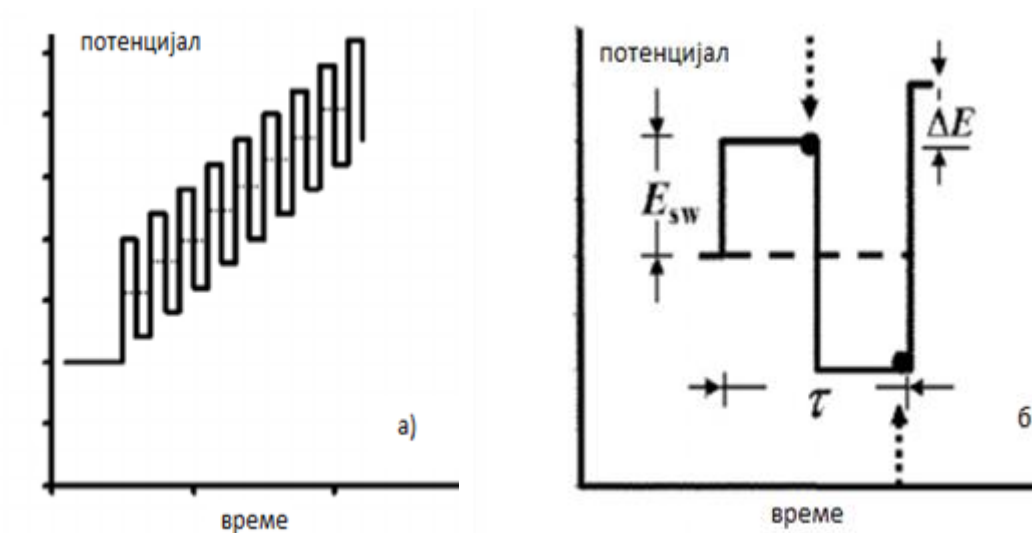
квантитативно определување на голем број аналити, сепак природата на инструменталниот одговор кај оваа техника овозможува главна примена на оваа техника за определување на механизмите на електрохемиска трансформација [book R. Compton, C. Banks, Understanding voltammetry]. Поради тоа, оваа техника е наречена и “електрохемиска спектроскопија”.

Пулсните волтаметриски техники се воведени како пандан на цикличната волтаметрија. Овие техники овозможуваат поголема аналитичка осетливост, а истовремено даваат можност за увид во механизмот на електрохемиската реакција, слично како и цикличната волтаметрија. Менувањето на аплицираниот потенцијал во форма на пулсеви и мерењето на струјата на крајот од тие пулсеви, овозможува да се постигне значително диференцирање на “Фарадеевата струја” (струјата од интерес) во однос на т.н. капацитетна струја. Додека Фарадеевата струја е резултат на процесот на размена на електрони помеѓу работната електрода и аналитот од интерес, капацитетната струја е еден вид “паразитска струја” што е резултат на перманентна промена на полнежите во т.н. двоен електричен слој на границата електрода/електролит поради постојаната промена на потенцијалот. Капацитетната струја не е пожелна за кинетички и аналитички цели и нејзина минимизација може ефективно да се изведе со начинот на мерење на струјата во пулсните волтаметриски техники.

Во фамилијата на пулсни волтаметриски техники најпознати се диференцијалната пулсна волтаметрија (англиски differential pulse voltammetry), и квадратно брановата волтаметрија (англиски squarewave voltammetry). Во основата на сите пулсни техники е тенденцијата преку начинот на мерењето на струјата да се зголеми односот на Фарадеевата во однос на капацитетната струја. Додека Фарадеевата струја опаѓа пропорционално со $t^{-1/2}$ (за т.н. дифузно-контролирани електродни реакции), за овие реакции, капацитетната струја опаѓа експоненцијално со времето. Според тоа, со мерење на струите на крајот на применетите потенцијални пулсеви, ќе се детектираат значително помали вредности на капацитетните струи, додека вредностите на Фарадеевите струи ќе бидат многу поголеми. На овој начин значително ќе се зголеми осетливоста на пулсните волтаметриски техники.

Карактеристични параметри на потенцијалот кај пулсните волтаметриски техники се: амплитудата-што претставува висина на аплицираниот потенцијален пулс; ширина на потенцијалниот пулс-што во суштина е времетраењето на потенцијалниот пулс; период на мерење на струјата-што е дефиниран како

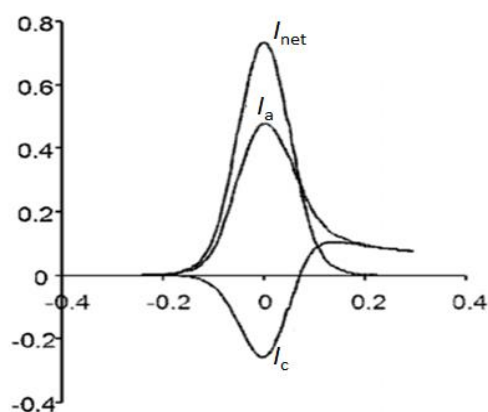
временски сегмент на крајот на потенцијалниот пулс во кој се мери струјата во текот на тој пулс. Овие параметри кај техниката квадратно-бранова волтаметрија се прикажани на слика 5.



Слика 5. Форма на потенцијалот во техниката квадратно бранова волтаметрија а) и карактеристични величини на еден потенцијален пулс во оваа техника б). E_{sw} е амплитуда на пуслот (mV); ΔE е потенцијален инкремент (mV), t е времетраење на потенцијалниот пулс (s), додека точката означува времето каде се мери струјата во текот на еден потенцијален пулс.

Квадратно бранова волтаметрија

Квадратно брановата волтаметрија (SWV) е една од најсофистицираните техники во фамилијата на пулсни волтаметриски техники. Потенцијалната форма во SWV се состои од симетрични квадратно бранови пулсеви со постојана амплитуда E_{sw} , кои се нанесуваат на скалеста потенцијална рампа (слика 5a). Потенцијалот во SWV се менува за постојан чекор ΔE . Струјата во оваа техника се мери два пати на крајот од секој пулс (слика 5б). Струите измерени на крајот од анодните потенцијални пулсеви ја даваат оксидативната (анодната) компонента на струјата, додека струите измерени на крајот на катодните потенцијални пулсеви ја даваат редуктивната (катодната) компонента на струјата (слика 6).



Слика 6. Приказ на квадратно бранов волтамограм за т.н. дифузиона електрохемиска реакција. Со I_a е означена т.н. оксидативна (анодна) компонента на струјата (дефинирана како позитивна струја), додека со I_c е означена редукциската (катодната) компонента на струјата (дефинирана како негативна струја). I_{net} е вкупната (net) струја која е дефинирана како разлика помеѓу I_a и I_c .

Вкупната струја во SWV се добива како разлика помеѓу анодната и катодната компонента на струјата. Но, бидејќи редукциските струи (по дефиниција) имаат негативен знак, вкупната струја во SWV е всушност сума на апсолутните вредности на двете струјни компоненти (слика 6). Овој метод на мерење ја прави SWV многу осетлива електроаналитичка техника. Измерената струја на пиковите добиени во SWV, како и во другите пулсни волтамметриски техники, е пропорционална на концентрацијата на аналитот. Кај оваа техника често се достигнуваат граници на детекција во суб-микромоларни подрачја. Покрај тоа, квадратно брановата волтамметрија овозможува и истовремен увид во двете електродни реакции (полуреакциите на оксидација и редукција). На овој начин, квадратно брановата волтамметрија е слична со цикличната волтамметрија, што овозможува оваа техника да се применува за проучување на механизмите на електрохемиски реакции. Квадратно брановата волтамметрија е брза електрохемиска техника, што овозможува мерење на кинетиката на електронските трансфери на електродните реакции, како и на кинетиката и термодинамиката на хемиски реакции што евентуално се поврзани со електродната реакција на аналитот што го испитуваме.

Покрај за кинетички и механистички студии, квадратно брановата волтамметрија, поради нејзината висока осетливост кон аналити со различна природа, е една од волтамметриските техники што интензивно се употребува во

дизајнот на биосензори за квантитативно определување на голем број важни супстанции.

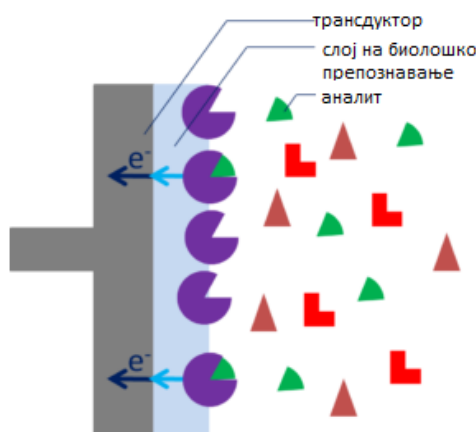
Волтаметриски сензори

Воспоставувањето на голем број медицински дијагнози се темели врз резултатите добиени со помош на малите преносни системи во кои спаѓаат и биосензорите. Ваквите тестови кои се наоѓаат во непосредна близина на пациентите (POCT-point of care testing) се одликуваат пред сè со голема економичност и брзина. Биосензорите наоѓаат примена при анализа на храна, дизајн на лекови, форензички анализи, мониторинг на животната средина...

Сензорите се системи кои се способни дефинирано својство, добиено преку одвивање на дадена хемиска реакција/физички процес, да го претворат во електричен сигнал. Притоа, преку интензитетот на електричниот сигнал може да ја определиме концентрацијата на дефинираната супстанца што учествува во хемиската реакција. Биосензорите се најчесто мали уреди што содржат биорецептори (ензим, антитело, микроорганизми, РНК, ДНК) соодветно имобилизирани на конвертор на хемиски сигнали во електрични (мерни електроди).

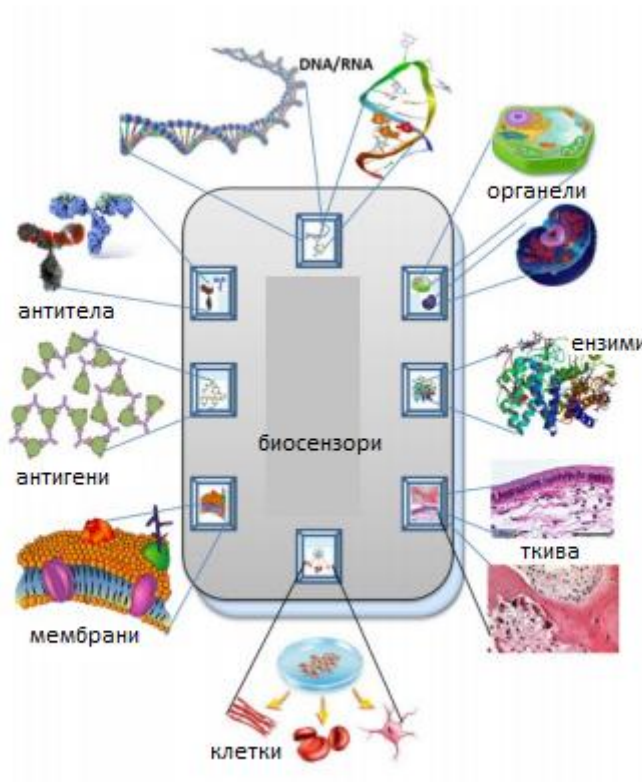
Thevenoat предложи една од многуте дефиниции за биосензорите:

“Биосензорите се независни интегрирани уреди кои можат да обезбедат одредени квантитативни или семиквантитативни информации засновани како резултат на директниот контакт на биохемискиот рецептор со трансдукторот”.



Слика 7. Шематски приказ на биосензор

Електрохемиските биосензори се едни од најзастапените видови на биосензори. Тие се разликуваат од другите биоаналитички системи кај кои е потребна дополнителна подготовка на аналитите. Биосензорите се состојат од две главни компоненти: (а) елементот за биолошка идентификација кој реагира со целниот аналит и (б) трансдуктор што ја трансформира интеракцијата во електричен сигнал.



Слика 8. Биорецептори за модификација на електродата при изградбата на биосензори

Основни карактеристики со кои се одликуваат сензорите се:

Селективност-способност на сензорот да одговори на целниот аналит. Висок степен на селективност е најпосакуваниот параметар на биосензорите, но исто така е важно и да се знае во кои концентрации други супстанции (интерференти) го попречуваат одговорот на сензорот.

Време на одговор-е време што е неопходно да се добие 95 % од инструменталниот одговор.

Линеарност-е ранг на концентрации во кој сензорот дава релевантни резултати

Осетливост-при која најмала концентрација на аналитот е релевантен биосензорот.

Во литературата постојат податоци за волтамметриски биосензори за мочна киселина, албумини и билирубин и некои од карактеристиките на тие биосензори се дадени во оваа семинарска работа.

ТЕОРЕТСКИ ОСНОВИ

Определувањето на релевантни физиолошки активни компоненти присутни во хуман серум со волтамметриски методи е значаен сегмент во дизајнирањето на амперометриски сензори за тие системи. Во литературата се познати повеќе методи за дизајнирање на вакви сензори, што се одликуваат со релативно едноставен експериментален систем што нуди можност за брзо квантитативно определување на дефинирани компоненти присутни во хуман серум.

Така, во трудот [4] авторите вршеле истражувања за селективно и симултано определување на допамин и мочна киселина со помош на квадратно бранова волтамметрија, при што како работна електрода е користена стаклена јаглеродна електрода (GCE) модифицирана со poly-procaterol hydrochlorid (p-ProH). Притоа, утврдено е дека во примероци од хуман серум и урина растворени во фосфатен пуфер со $pH=5.0$ се добиваат убаво раздвоени пикови на допамин и мочна киселина, со граници на детекција од $0.3 \mu\text{mol/L}$ и $0.5 \mu\text{mol/L}$, соодветно. Самата електрода се одликувала со едноставност во конструкцијата, репродуктивност, висока стабилност, селективност и добра сензитивност.

Друга група автори работеле на определување на холестерол во хуман серум користејќи волтамметриски техники, при што како електролит е употребен фосфатен пуфер со $pH=6.86$ [5]. Се знае дека холестерол го зголемува ризикот за развој на кардиоваскуларни болести, а има и лошо влијание врз имуниот систем. Авторите од овој труд користеле органомодифицирана работната електрода. Границата на детекција за холестерол со овој сензор била $0.01 \mu\text{M}$.

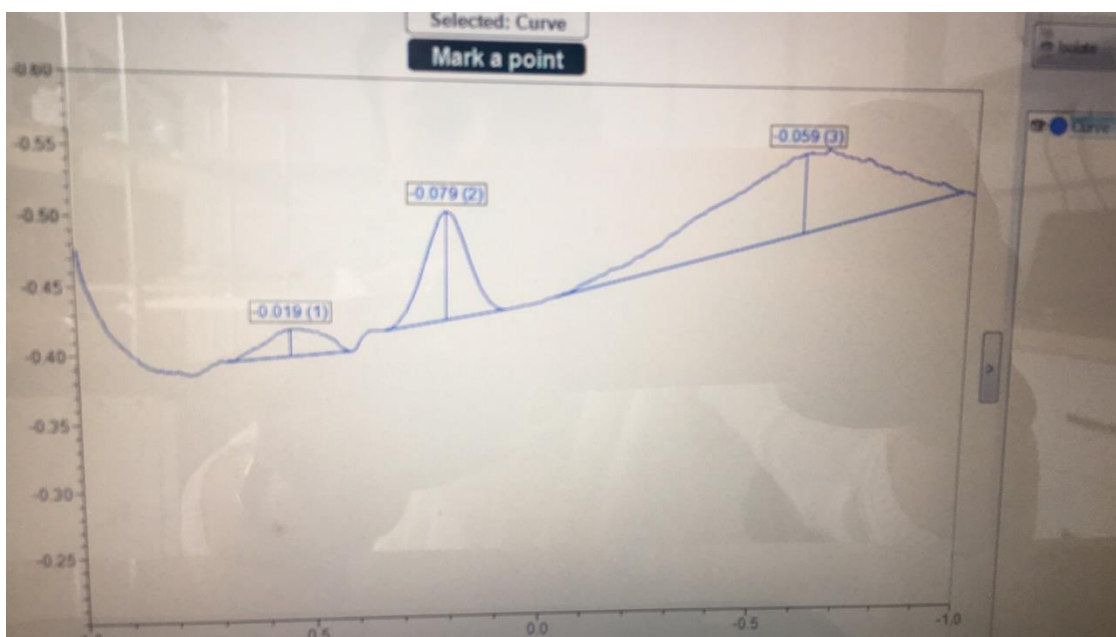
Волтамметриски сензор базиран на SPCE (screen printed electrodes) за определување на мочна киселина во клинички примероци од серум е претставен во трудот [6]. Со употреба на квадратно бранова волтамметрија, авторите покажале дека е можно да определат мочна киселина во серум растворен во фосфатен пуфер со $pH=7.0$. Притоа, работната електрода е модифицирана со N, N-диметилформамид.

Определената границата на детекција за мочна киселина е $1.9 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$. Предложениот сензор покажал многу висока репродуктивност и репродуцибилност. Најмногу проблеми при определувањето со овој сензор имале од страна на ацетаминофен, допамин и аскорбинска киселина, кои се јавувале како интерференти при добивањето на одговорите од мочна киселина.

Во трудот [7] истражувачите биле фокусирани кон селективно квантитативно определување на билирубин со помош на SPE модифицирани со наноматеријали, MWCNT (multi walled carbon nanotubes) и графен. Притоа, употребен е примерок добиен од комерцијален лиофилизиран крвен серум разреден со помош на фосфатен пуфер со $\text{pH}=7.2$. Непознатата концентрација на билирубин е определена како резултат на конструираната калибрациона крива. Границата на детекција за билирубин била $0.3 \pm 0.022 \text{ nM}$.

Во трудот [9] авторите со помош на анодна диференцијална пулсна стрипинг волтаметрија се обиделе да одредат холин и ацетилхолин кај примероци од хуман серум. Притоа, користена е работна GCE, чија работна површина била модифицирана со помош на ензимите холин оксидаза и ацетилхолин естераза на графен оксид јонска течност.

Главна цел на нашите истражувања ќе биде дизајнирање на едноставен амперометриски сензор за директно симултано определување на мочна киселина, билирубин и албумини во хуман крвен серум. Првичните сознанија од студиите покажуваат дека симултаното определување на овие три системи е возможно со употреба на квадратно-бранова волтаметрија како работна техника (слика 9). Комплексното електрохемиско однесување на испитуваните компоненти присутни во хуман серум е тесно поврзано со кинетиката на хемиските реакции во кои се вклучени истите. Притоа, како работна електрода ќе бидат тестирани различни типови на графит. Првичните испитувања покажаа дека модифицирањето на работните лектроди со помош на јаглеродни нано честички е неопходен чекор за да се добие повисока осетливост и поголема репродуцибилност на аналитичката постапка.



Слика 9. Директна квадратно бранова волтамметрија на мочна киселина, билирубин и албумини во хуман серум. Како работна електрода е користена стаклеста јаглеродна електрода. Како основен електролит е употребен фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7.4$. Другите експериментални услови се: фреквенција $f = 8 \text{ Hz}$, амплитуда $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$, потенцијален чекор $dE = 1 \text{ mV}$.

Покрај тоа, ќе биде извршена и оптимизација во однос на инструменталните параметри и на експерименталните услови (природа на пуфер, pH на пуфер, временска дистанца на анализирање после добивањето на хуманиот серум), со што ќе се добијат релевантни податоци за аналитичката метода. Студирањето на интерференците присутни во хуманиот серум ќе биде еден од приоритетите на истражувањето. Со употреба на соодветен сет на статистички анализи, ќе се определат сите релевантни параметри неопходни за целосна карактеризација на амперометрискиот сензор. Ќе биде направен обид за поврзување на сите компоненти во минијатурен електричен систем, со што ќе се овозможи негова функционалност и практична примена во различни лабораториски услови.

ЗАКЛУЧОК

Биосензорите дизајнирани за директно и симултано определување на дефинирани физиолошки компоненти во хуман серум се важен сегмент за брза биохемиска лабораториска дијагностика. Амперометриските волтаметриски сензори се електронски системи што се лесни за изведба, даваат брз резултат и овозможуваат симултано квантитативно определување на повеќе компоненти присутни во хуман серум. Дизајнирањето на амперометриски сензор за симултано определување на мочна киселина, билирубин и вкупни албумини со примена на квадратно-бранова волтаметрија ќе биде во фокусот на истражувањата поврзани со докторската дисертација. Резултатите од иницијалните испитувања покажуваат дека е возможно симултано определување на овие три хемиски системи во хуман серум со примена на квадратно-бранова волтаметрија како работна техника, со употреба на графитна електрода модифицирана со јаглородни нано-цевчиња. Оптимизацијата на експерименталните услови, влијанието на интерферентите и определувањето на карактеристиките на сензорот ќе бидат главни сегменти во истражувањата поврзани со докторската дисертација. Притоа, крајната цел од истражувањата ќе биде дизајнирање на електронски функционален систем што ќе овозможи брзо и симултано квантитативно определување на мочна киселина, билирубин и албумини во хуман серум.

LITERATURE

- [1] Gulaboski R.; Mirceski V.; Bogeski I.; Hoth M. *Protein film voltammetry: electrochemical enzymatic spectroscopy. A review on recent progress*; J. Solid State Electrochem. 16, 2315-2328, 2012.
- [2] Mirceski V.; Gulaboski R.; Lovric M.; Bogeski I.; Kappl R.; Hoth M. *Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress*; Electroanal. 25, 2411–2422, 2013.
- [3] Thevenot D. R.; Toth K.; Durst R. A.; Wilson G. S. *Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification*; Biosens. Bioelectron. 16, 121, 2001.
- [4] Kong D.; Zhuanga Q.; Hana Y.; Xua L.; Wang Z.; Jiangb L.; Sua J.; Lub C. H.; Chib Y. *Simultaneous voltammetry detection of dopamine and uric acid in human serum and urine with a poly (procaterol hydrochloride) modified glassy carbon electrode*; Talanta 185, 203-212, 2018.
- [5] Derina K. V.; Korotkova E. I.; Dorozhko E. V.; Voronova O. A. *Voltammetric determination of cholesterol in human blood serum*; Journal of Analytical Chemistry 72, 904-910, 2017.
- [6] Metto M.; Eramias S.; Gelagay B.; Washe A. P. *Voltammetric Determination of Uric Acid in Clinical Serum Samples Using DMF Modified Screen Printed Carbon Electrodes*; International Journal of Electrochemistry, 1-8, 2019.
- [7] Thangamuthu M.; Gabriel V. E.; Santschi C.; Martin O. J. F. *Electrochemical Sensor for Bilirubin Detection Using Screen Printed Electrodes Functionalized with Carbon Nanotubes and Graphene*; Sensors (Basel), 18(3): 800, Mar 2018.
- [8] Mittal S. K.; Rana S.; Kaur N.; Banks C. E. *A voltammetric method for Fe (III) in blood serum using a screen-printed electrode modified with a Schiff base ionophore*; Analyst, Issue 12, 2018.
- [9] Albishri H. M.; El-Hady D. A. *Hyphenation of enzyme/graphene oxide-ionic liquid/glassy carbon biosensors with anodic differential pulse stripping voltammetry for reliable determination of choline and acetylcholine in human serum*; Elsevier, Talanta, Volume 200, 107-114, 1 August 2019.

- [10] **R. Gulaboski**, V. Mirceski, R. Kappl, M. Hoth, M. Bozem, "Quantification of Hydrogen Peroxide by Electrochemical Methods and Electron Spin Resonance Spectroscopy" *Journal of Electrochemical Society*, 166 (2019) G82-G101.
- [11] S. Petkovska, **R. Gulaboski***, "Theoretical Analysis of a Surface Catalytic Mechanism Associated with Reversible Chemical Reaction Under Conditions of Cyclic Staircase Voltammetry", *Electroanalysis* 32 (2020) 992-1004 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201900698>
- [12] **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, Milivoj Lovric, Square-wave protein-film voltammetry: new insights in the enzymatic electrode processes coupled with chemical reactions, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 23 (2019) 2493-2506.
- [13] **Rubin Gulaboski**, Electrochemistry in 21st Century-Future Trends and Perspectives, *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) doi:10.1007/s10008-020-04550-0
- [14] Milkica Janeva, Pavlinka Kokoskarova, Viktorija Maksimova, **Rubin Gulaboski***, Square-wave voltammetry of two-step surface redox mechanisms coupled with chemical reactions-a theoretical overview, *Electroanalysis*, 31 (2019) 2488-2506.
- [15] **Rubin Gulaboski**, Milkica Janeva, Viktorija Maksimova, "New Aspects of Protein-film Voltammetry of Redox Enzymes Coupled to Follow-up Reversible Chemical Reaction in Square-wave Voltammetry", *Electroanalysis*, 31 (2019) 946-956 .
- [16] Sofija Petkovska, **Rubin Gulaboski***, "Diffusional Electrochemical Catalytic (EC') Mechanism Featuring Chemical Reversibility of Regenerative Reaction-Theoretical Analysis in Cyclic Voltammetry", *Croatica Chemica Acta* 92 (4) (2019) 495-502.
- [17] **Rubin Gulaboski**, Pavlinka Kokoskarova, Sonja Risafova, "Analysis of Enzyme-Substrate Interactions from Square-Wave Protein-Film Voltammetry of Complex Electrochemical-Catalytic Mechanism Associated with Reversible Regenerative Reaction" *Journal of Electroanalytical Chemistry* 866 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114189>
- [18] **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, Sebojka Komorsky Lovric, Milivoj Lovric, "Three-phase electrodes: Simple and Efficient Tool for Analysis of Ion Transfer Processes Across Liquid-Liquid Interface. Twenty Years On" *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) <https://link.springer.com/article/10.1007/s10008-020-04629-8>
- [19] **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, "Simple Voltammetric Approach for Characterization of Two-step Surface Electrode Mechanism in Protein-Film Voltammetry", *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) <https://link.springer.com/article/10.1007/s10008-020-04563-9>.
- [20] Milkica Janeva, Pavlinka Kokoskarova, **Rubin Gulaboski***, "Multistep Surface Electrode Mechanism Coupled with Preceding Chemical Reaction-Theoretical Analysis in Square-Wave Voltammetry" *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* 12 (2020) 766-779.
- [21] S. Petkovska, **Rubin Gulaboski***, Theoretical Analysis of a Surface Catalytic Mechanism Associated with Reversible Chemical Reaction under Conditions of Cyclic Staircase Voltammetry, *Electroanalysis* 32 (2020) 992-1004.
- [22] Valentin Mirceski, Leon Stojanov, **Rubin Gulaboski**, " Double-sampled Differential Square-Wave Voltammetry" *Journal of Electroanalytical Chemistry* 866 (2020) in press
- [23] P. Kokoskarova, M. Janeva, V. Maksimova, **Rubin Gulaboski***, "Protein-film Voltammetry of Two-step Electrode Enzymatic Reactions Coupled with an Irreversible Chemical Reaction of a Final Product-a Theoretical Study in Square-wave Voltammetry", *Electroanalysis* 31 (2019) 1454-1464, DOI: 10.1002/elan.201900225
- [24] P. Kokoskarova, **Rubin Gulaboski***, Theoretical Aspects of a Surface Electrode Reaction Coupled with Preceding and Regenerative Chemical Steps: Square-wave

Voltammetry of a Surface CEC' Mechanism, *Electroanalysis* (2019) 333-344
doi.org/10.1002/elan.201900491

[25] **Rubin Gulaboski**, Theoretical contribution towards understanding specific behaviour of “simple” protein-film reactions in square-wave voltammetry”, *Electroanalysis*, 31 (2019) 545-553.

[26] V. Mirceski, D. Guziejewski, L. Stojanov, **Rubin Gulaboski**, Differential Square-Wave Voltammetry, *Analytical Chemistry* 91 (2019) 14904-14910
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.9b03035>.

[27] **Rubin Gulaboski**, P. Kokoskarova, S. Petkovska, Time independent methodology to assess Michaelis Menten constant by exploring electrochemical-catalytic mechanism in protein-film cyclic staircase voltammetry, *Croat. Chem. Acta*, 91 (2018) 377-382.

[28] **Rubin Gulaboski**, I. Bogeski, P. Kokoskarova, H. H. Haeri, S. Mitrev, M. Stefova, Marina, J. Stanoeva-Petreska, V. Markovski, V. Mirceski, M. Hoth, and R. Kappl, *New insights into the chemistry of Coenzyme Q-0: A voltammetric and spectroscopic study. Bioelectrochemistry* 111 (2016) 100-108.

[29] **Rubin Gulaboski**, V. Markovski, and Z. Jihe, *Redox chemistry of coenzyme Q—a short overview of the voltammetric features*, *Journal of Solid State Electrochemistry* 20 (2016) 3229-3238.

[30] Haeri, Haleh H. I. Bogeski, **Rubin Gulaboski**, V. Mirceski, M. Hoth, and R. Kappl, *An EPR and DFT study on the primary radical formed in hydroxylation reactions of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone*. *Mol. Phys.* 114 (2016) 1856-1866.

[31] V. Mirceski, D. Guziejewski and **Rubin Gulaboski**, Electrode kinetics from a single square-wave voltammograms, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 34 (2015) 1-12.

[32] **Rubin Gulaboski** and V. Mirceski, New aspects of the electrochemical-catalytic (EC') mechanism in square-wave voltammetry, *Electrochimica Acta*, 167 (2015) 219-225.